

学校编码: 10384

分类号____ 密级秘密

学号: 21620131152629

UDC____

廈門大學

硕士学位论文

人免疫缺陷病毒 1 型膜蛋白 gp41 区段的原核表
达与中和单抗筛选及其表位预测

Study on the Neutralization Epitopes of Human
Immunodeficient Virus-1 Envelope Membrane Protein gp41

袁瑞雪

指导教师姓名: 夏宁邵教授

专业名称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2016 年 4 月

论文答辩时间: 2016 年 5 月

学位授予日期: 2016 年 月

答辩委员会主席:

评 阅 人:

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（ ）课题组的研究成果，获得（ ）课题（组）经费或实验室的资助，在（ ）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

() 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

() 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目录

目录.....	I
Content.....	III
摘要.....	VI
Abstract.....	VII
缩略词.....	IIX
前言.....	1
1 HIV-1 概述.....	1
1.1 HIV-1 背景介绍.....	1
1.2 HIV-1 基因组及其功能.....	2
1.3 HIV-1 蛋白的结构特征.....	4
1.4 HIV-1 生活周期及感染机制.....	11
2 对 gp41 表位的展示策略.....	13
2.1 利用病毒颗粒表面展示表位的策略.....	13
2.2 利用表位架展示表位的策略.....	15
3 HIV-1 现有的广谱中和单抗及疫苗研究进展.....	17
3.1 广谱中和单抗阻断 HIV-1 感染的机制.....	17
3.3 HIV-1 疫苗研究进展.....	23
4 本论文的研究思路及意义.....	24
材料与方法.....	25
1 材料.....	25
1.1 主要设备.....	25
1.2 实验试剂与材料.....	27
1.3 常用溶液及培养基配制.....	29
2 实验方法.....	33
2.1 分子生物学实验方法.....	33
2.2 哺乳动物细胞培养操作.....	40

2.4 小鼠免疫方法.....	42
2.5 单克隆抗体的制备.....	44
2.6 同源模建与分子对接.....	51
结果与分析.....	53
1 重组蛋白区段表达与鉴定.....	53
1.1 重组蛋白区段构建表达.....	53
1.2 MPER 蛋白活性检测.....	57
1.3 本节小结.....	57
2 免疫策略与单抗制备.....	58
2.1 NHR-CHR 蛋白免疫策略与单抗性质鉴定.....	58
2.2 MPER 蛋白免疫策略与单抗性质鉴定.....	61
2.3 保守区段蛋白免疫策略及血清效价.....	64
2.4 本节小结.....	66
3 中和单抗与 gp41 重组蛋白和病毒反应性验证.....	67
3.1 中和单抗与重组 gp41 蛋白的结合能力分析.....	67
3.2 中和单抗与病毒的反应性验证.....	69
3.3 病毒与细胞吸附后的中和能力验证 (PAN).....	71
3.4 本节小结.....	71
4 中和单抗 10D5 和 4H4 的表位分析.....	72
4.1 中和单抗 10D5 对重组 gp41 的 Western Blot 检测.....	72
4.2 中和单抗 10D5 对重组 gp41 截短肽的 Western Blot 检测.....	73
4.3 利用分子对接技术预测 4H4 与 MPER 结合位点.....	74
4.4 本节小结.....	76
讨论.....	77
1 gp41 广谱中和单抗免疫方案及抗体筛选摸索.....	77
2 抗体性质鉴定及优化.....	78
3 区段展示策略优化.....	79
4 HIV-1 广谱中和单抗的研究重点.....	81
小结与展望.....	82
参考文献.....	83
致 谢.....	89

Content

Contents.....	III
Abstract.....	VII
Abbreviations.....	IX
Preface.....	1
1 Overview of HIV-1.....	1
1.1 Background of HIV-1.....	1
1.2 Function of HIV-1 genome.....	2
1.3 Characteristics of HIV-1 protein.....	4
1.4 Life cycle and infection mechanism of HIV-1.....	10
2 Strategy of gp41 epitope exhibition.....	13
2.1 The strategy of epitope exhibition on VLP.....	13
2.2 The strategy of epitope exhibition on scaffold.....	15
3 The development of HIV-1 bNAbs and vaccine.....	17
3.1 The blocking mechanism of HIV-1 bNAbs.....	17
3.2 The research development of HIV-1 vaccine.....	23
4 The objectives and significance.....	24
Materials and Methods.....	26
1 Materials.....	26
1.1 Main equipments.....	26
1.2 Reagents and materials	28
1.3 Solutions and substrate preparation	30
2 Methods.....	34
2.1 Molecular cloning technology	34
2.2 The operation of mammal cells culture	42

2.3 Operation of HIV-1	43
2.4 Mice immunolization method	43
2.5 Monoclonal antibody preparation.....	45
2.6 Homology modeling and molecular docking.....	52
Results.....	54
1 Expression and verification of reconstruction protein section.....	54
1.1 Expression of reconstruction protein section.....	54
1.2 Activity assessment of MPER.....	58
1.3 Summary.....	58
2 Immunization strategy and mAb preparation.....	59
2.1 CHR immunization strategy and mAb verification.....	59
2.2 MPER immunization strategy and mAb verification.....	62
2.3 Conserved sections immunization strategy and serum assessment.....	65
2.3 Summary.....	67
3 Interaction assessment between nAbs and virus and protein.....	68
3.1 Interaction analysis of nAbs and gp41	68
3.2 Interaction analysis of nAbs and virus.....	70
3.3 PAN of nAbs.....	72
3.4 Summary.....	72
4 Epitope analysis of nAb 10D5 and 4H4.....	73
4.1 Westen Blot verification of nAb 10D5 and gp41	73
4.2 Western Blot verification of nAb 10D5 and truncated gp41.....	73
4.3 Molecular docking of 4H4 and MPER.....	74
4.4 Summary.....	75
Discussion.....	77
1 The exploration of gp41 bNAbs screening.....	77
2 The optimization and identification of antibodies.....	78
3 Sections exhibition strategy optimization.....	79
4 The research emphasis of HIV-1 bNAbs.....	81

Summary and path forward.....	82
References.....	83
Acknowledgement.....	89

厦门大学博士论文摘要库

摘要

自 1983 年人类免疫缺陷病毒 HIV 被发现及鉴定以来,特别是从 HIV 感染者体内分离克隆 B 淋巴细胞,不断地获得针对 HIV Env 不同表位的广谱中和单抗。其中针对 HIV Env 保守区域的中和单抗通常具有较好的广谱性和有效性。对于 Env gp41 上的保守表位,主要集中在近膜端膜外区(MPER)。该区域糖基化修饰程度低于 gp120,相应表位区的抗体具有良好的广谱性,但由于表位区瞬态暴露,通常又难以被诱导出有效抗体。对于 gp41 的氨基端螺旋区(NHR)和羧基端螺旋区(CHR)区域,目前尚未发现广谱中和抗体。

本研究利用原核表达系统表达的 gp41 MPER 区段与 NHR 至 CHR 区段,以及位于 NHR 和 CHR 中的四个保守区段,来进行 HIV-1 中和抗体的筛选。HIV-1 gp41 的 MPER 区段以及四个保守区段的构建载体为 HBV core 149, NHR-CHR 构建载体为 pTO-T7,构建所选用的区段序列均来自 HIV-1 B 亚型的 NL4-3 毒株。免疫血清检测显示 MPER 区段和 NHR-CHR 区段的免疫可诱导产生中和抗体,而四个保守区段的嵌合蛋白则无法有效诱导中和抗体。使用体外中和试验进行单抗筛选, NHR-CHR 的免疫组筛选得到 9 株对 HIV_{NL4-3} 具有中和能力的单抗。通过 ELISA, 免疫荧光, 流式细胞术及感染后中和试验(PAN)等方式对抗体性质进行了分析。其中 10D5 和 10E11 与 gp41 三聚体反应性较好,利用 gp41 的多肽步移法进行 Western Blot 检测表明 10D5 识别的表位位于 CHR 区域。使用 HBc149-MPER 免疫的免疫组中筛选得到 5 株具有中和活性的抗体,其中 4H4 具有 HIV-1 型内交叉中和效果,对 B 亚型的 HIV_{NL4-3} 和 HIV_{89.6} 具有中和活性。克隆 4H4 单抗细胞的抗体基因,利用同源建模和分子对接,预测了其 HIV_{NL4-3} MPER 上的关键结合位点位于 W664、L667、和 F671。

综上所述,本研究完成了 gp41 的 NHR-CHR 和 MPER 区段的原核表达、抗体筛选以及抗体性质研究,对于筛选得到的具有中和活性的单抗,定位了抗体识别的区域,同时也预测了型内交叉单抗与病毒的关键结合位点,为 HIV-1 的病毒学和疫苗设计提供了有用的信息。后续的工作将进一步优化对 gp41 区段的展示和免疫策略,以获取更有效的中和单抗。

关键字: 人免疫缺陷病毒包膜蛋白 gp41; 近膜端膜外区; 中和抗体

Abstract

Ever since the Human Immunodeficiency Virus (HIV) discovered in 1983, numerous antibodies targeting different HIV Env epitopes have been separated from the particular AIDS patients' B lymphocyte cells. Antibodies targeting the conserved HIV Env epitopes exhibit a better potency and wide spectrum ability. The present discovered conserved epitopes of Env gp41 mainly locate on the MPER section. Besides, gp41 galactosylated modification is less than gp120, so the gp41 antibodies often show broad potency, but meanwhile also more difficult to induce because of the transient exposure of effective epitopes. At present, no potent broad neutralizing antibodies targeting gp41 N-terminal helical region (NHR) and N-terminal helical region (CHR) have been discovered.

In this study, two gp41 sections MPER and NHR-CHR, and four conserved sections in NHR and CHR, are expressed by prokaryotic expression system, followed by used as the immunogen to immune Balb/C mice. The MPER and four conserved sections are constructed on the vector HBV core 149, while the NHR-CHR section is carried by vector pTO-T7. The section sequences all derive from HIV-1 clade B NL4-3 strain. The mice serum test shows that the MPER and NHR-CHR sections can induce potent neutralizing antibodies, while the four conserved chimeric proteins can not elicit neutralizing antibodies. The neutralizing antibodies are mainly screened by neutralization assay using neutralization test *in vitro*. 9 monoclonal antibodies are screened out from the NHR-CHR immunogen group, which all exhibit neutralization potency to HIV_{NL4-3}. The verification methods of these antibodies are conducted by ELISA, immune fluorescence, flow cytometry and post attachment neutralization assay (PAN). The mAb 10D5 and 10E11 are proved to own the ability to interact with gp41 trimer. Through the gp41 truncation Western Blot verification, the recognition region of 10D5 is founded to be located in CHR region. Meanwhile, 5 monoclonal antibodies are screened out from the HBc 149-MPER immunogen group. 4H4 shows the strain-cross neutralization ability that can neutralize the HIV_{NL4-3} and HIV_{89.6}.

After applying the homology modeling and molecular docking to 4H4 antibody cell gene, the key interacting sites between 4H5 and HIV_{NL4-3} are predicted to be W664, L667 and F671.

In conclusion, this study conducted the gp41 NHR-CHR and MPER section prokaryotic expression, antibody screening and verification. Besides, the recognition sites of NHR-CHR antibody 10D5 and the key interaction sites of strain-cross neutralization antibody are predicted, which provides the useful information to the HIV-1 virology and vaccine research.

Key words: Human Immunodeficiency Virus Env gp41; MPER; Neutralizing antibody

缩略词

缩写	英文名称	中文名称
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome	获得性免疫缺陷综合症
HIV	Human Immunodeficiency Virus	人类免疫缺陷病毒
ENV	Envelope Glycoprotein	包膜糖蛋白
Gag	Major structural protein	主要结构蛋白
CA	Capsid protein p24	衣壳蛋白
MA	Matrix Protein p17	基质蛋白 p17
NC	Nucleocapsid protein p7	核衣壳体蛋白
SU	Surface glycoprotein gp120	包膜糖蛋白 gp120
TM	Transmembrane glycoprotein gp41	包膜糖蛋白 gp41
MPER	Membrane Proximal External Region	近膜胞外区
Pol	Polymerase	聚合酶
IN	Integrase	整合酶
RT	Reverse Transcriptase	逆转录酶
REV	Regulator of expression of viral protein	病毒表达调控蛋白
Vif	Virion Infectivity Factor	病毒感染因子
Vpr	Viral Protein Regulator	病毒蛋白 R
Vpu	Viral Protein Unknown gene	病毒蛋白 U
Tat	Trans-activator of Transcription gene	转录活性因子
Nef	Negative Effector	负调控因子
bp	Base Pair	碱基对
LTR	Long Terminal Repeat	长末端重复序列
MW	Molecular Weight	分子量
kD	kilo Daltons	千道尔顿
nt	Nucleotide	核苷
Ori	Origin	复制起始位点
bNAbs	Broad Neutralization Antibodies	广谱中和单抗

HEK 293	Human Embryo Kidney Cells 293293	人胚肾细胞
GAM	Goat Anti-Mouse	羊抗鼠
RFP	Red Luorescence Protein	红色荧光蛋白
GFP	Green Luorescence Protein	绿色荧光蛋白
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
Kan	Knamycin	卡那霉素
FCM	Flow Cytometry	流式细胞分析仪
HAART	Highly Active Antiretro Viral Therap	高活性抗逆转录病毒治疗
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbant Assay	酶联免疫吸附试验
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清
IC50	50% Inhibitory Concentration	50%抑制浓度
TCID50	50% Tissue Culture Infection Dose	50%组织感染浓度
WT	Wild Type	野生型
PBS	Phosphate Bufferred Saline	磷酸盐缓冲液
EDTA	Ethylene Diamine Tetractic Acid	乙二胺四乙酸
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate	十二烷基磺酸钠
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoeresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
His	Histidine	组氨酸
FITC	Fluorescein Isothiocyanate	异硫氰胺荧光素
PAN	Post Attachment Neutralization	吸附后中和试验

前言

1 HIV-1 概述

1.1 HIV-1 背景介绍

艾滋病（Acquired Immunodeficiency Syndrome, AIDS），即人获得性免疫缺陷综合症，是由人类免疫缺陷病毒（Human Immunodeficiency Virus, HIV）感染所引起。HIV 感染人体后，主要表现为 T 细胞的免疫功能缺陷^[1]。AIDS 在 1981 年的美国一同性恋体内首次发现，1983 年巴斯德研究所成功分离出病原人类免疫缺陷病毒（HIV）。从 HIV 被发现以来，30 多年内已对全球超过 6000 万人造成影响，间接或直接导致 2500 万人死于与此相关的疾病。截止 2015 年底，保守估计全球 HIV 感染人数已逾 3690 万人，AIDS 俨然已经成为威胁全人类生存的致命杀手。

国际上通过对病毒核酸序列的测定和血清学反应，将 HIV 分成了两个型别 HIV-1 与 HIV-2，两个型别的核苷酸同源性为 45%。其中 HIV-1 便是引发 AIDS 全球传播的主要致病原，而 HIV-2 只在少数非洲地区流行，且致病能力较弱。根据 1999 年发表的《HIV-1 命名建议》，将 HIV-1 分为了组(group)、亚型(subtype)、亚亚型(sub-subtype)和流行重组型(Circulating Recombinant Form, CRF)。根据 env 基因（编码包膜蛋白）的和 gag 基因（编码壳蛋白）的序列的同源性比较结果，又将 HIV-1 分为三个组，分别为 M 组（主要组，main），O 组（外围组，outline）和 N 组（non-M-non-O group）。三个组之间的离散率为 30%–50%，其中 M 组对人类健康影响最大并且流行最为广泛，约占所有 AIDS 患者的 90%。而 M 组又据依据 env 区序列的不同，又可以进一步细分成 A、B、C、D、E、F、G、H、I、J 和 K 共 11 种亚型，以及 CRF01-CRF34 共 34 种流行重组型（CRFs）。

HIV 为具有包膜的 RNA 病毒，属逆转录病毒科（Retroviridae）、慢病毒属（Lentivirus）、灵长类慢病毒群（Primate lentivirus Group）。病毒颗粒呈二十面体，立体对称结构，其表面具有糖蛋白刺突结构（Spike），直径约为 100~120nm。因此，只有通过电子显微镜才能观察 HIV 颗粒，其包膜厚约 7.5nm，主体为磷脂双

分子层，与宿主细胞膜在组成和功能上存在明显差异。HIV 包膜在宿主细胞内合成，嵌有包膜糖蛋白 gp120 和 gp41，分别为病毒表面抗原外膜糖蛋白和跨膜糖蛋白。gp120 与 gp41 通过非共价键作用结合。HIV 病毒颗粒核心为锥形，p24 蛋白组成的半锥形衣壳（Capsid）中，含有 RNA 基因组、核心结构蛋白和病毒复制所需酶类（逆转录酶、整合酶、蛋白酶）等。蛋白 p17 构成了病毒外模和病毒核心间的球形基质（Matrix）。

1.2 HIV-1 基因组及其功能

HIV 基因组为两条相同的正股 RNA，每一条 RNA 长约 9.2-9.8Kb，基因组内有 9000 个碱基，包含 9 个基因片断，共编码 15 种蛋白。其中结构基因 gag 编码核心蛋白 p13、p17 和 p24；结构基因 env 编码包膜蛋白 gp120 和 gp41；pol 基因编码病毒复制所必需的逆转录酶，蛋白合成酶和内切核苷酸酶。tat、nef、rev、vpu、vpr 和 vif 为 HIV 的 6 种调节基因，编码功能不同的蛋白。其中 tat 为反式正向调节基因，能增强所有基因的表达，nef 与之相反是反式负相调节基因。rev 的作用是可以增强 env 与 gag 基因的表达。而 vpu、vpr 和 vif 则和 HIV 的成熟，装配与释放有直接关联。vpr、vpu 和 vif 三个调节基因，前两者编码病毒蛋白 R 和 U，后者编码病毒传染因子。HIV-1 与 HIV-2 的基因结构基本相同，不同的是 HIV-2 有 vpx 基因，而不存在 vpu 基因，基因结构如图 1 所示。

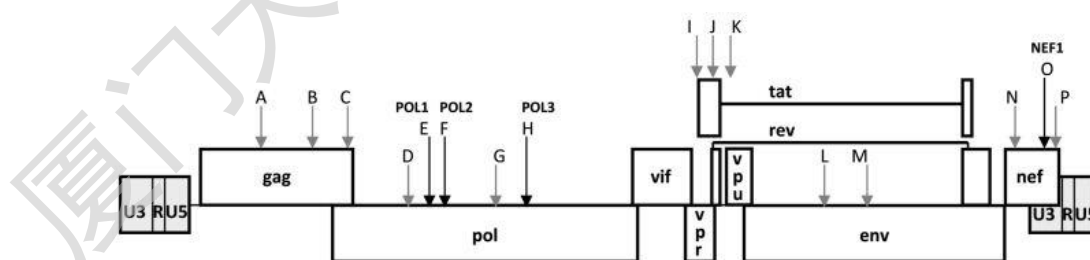


图 1. HIV-1 基因结构^[2]

Figure 1. The gene structure of HIV-1^[2]

在 HIV 的 RNA 5' 和 3' 两端有长末端重复序列 (Long Terminal Repeats, LTR)，包含了调控病毒基因表达的 DNA 序列，即顺势调控序列，控制了前病毒的表达。LTR 大小约 636bp，含有启动子，增强子和负调控区，可分为三个亚区：U3 区、

R 区和 U5 区。在 HIV 的复制过程中 LTR 具有重要作用，合成 HIV DNA 的第一条链的 tRNA 引物结合位点 (pbs) 位于 5'端 LTR 的 3'端一侧，第二条链的合成起始位点多聚嘌呤 (ppt)，位于 3'端的 LTR 的 5'端一侧。RNA 在完成反转录后，cDNA 的两端会形成一段 LTR，并且三区的排布顺序相同，都为(5')U3-R-U5(3')。在 R 区和 U5 区之间，还分布有聚腺苷酸化信号和加帽位点，二者形成一环状结构，从而可以被相应蛋白因子识别和结合^[3]。在 5'端 LTR 下游，还分布着包装信号和引物结合位点等。在 5'端的 LTR 后依次存在着 gag、pol 和 env 三个结构基因。

gag 与 pol 基因虽然用不同阅读框架，但部分存在重叠，重叠区域大小约为 80~170nt。gag 基因编码一个分子量为 55kD 的核心蛋白前体与分子量为 160kD 的 gag-pol 蛋白，而 gag 前驱蛋白 p55 被 pol 基因产物蛋白酶裂解称成熟的 p6、p9、p17 和 p24。其中 p9 与 RNA 基因组结合紧密，可促进 RNA 二聚体形成。pol 基因编码病毒复制所需酶系，如蛋白酶将 gag-pol 蛋白聚体降解成蛋白酶 pol、p32 整合酶与逆转录酶 p66/p51。由于 pol 基因不含 ATG 起始密码子，所以只可通过 gag 基因阅读框的改变进行转录翻译，并且在 pol 与 gag 的基因重叠区存在 pro 序列，在裂解 HIV 前体蛋白过程中该序列编码的蛋白酶 p16 起着重要调控作用^[4]。env 基因编码 HIV 的包膜糖蛋白 Env，该蛋白的初期产物大小为 88kD，后期经过糖基化加工后成为大小为 160kD 的包膜糖蛋白前体蛋白，之后再经过宿主细胞的蛋白酶加工修饰为膜外蛋白 gp120 和跨膜蛋白 gp41。然而在不同毒株间，env 基因具有很高的核苷酸序列差异性，这也是其最主要的一个特征。env 基因的可变区具有如此高度的变异性，可能由于以下一种或多种机制所导致：(1) RNA 聚合酶在 env 基因编码过程中不具备校正功能；(2) env 基因的聚合酶可直接暴露在 RNA 聚合酶环境下；(3) 由于免疫压力较大等外界因素，产生较强变异倾向，故而导致该区域基因重组率提升；(4) 对于变异缺少选择性，即允许任何不阻碍翻译的序列形式，表现为缺失、插入、导致、重复和点突变等常见变异。相对于此，从大量的 HIV 毒株全基因序列分析上看，gag 与 pol 基因区都相对比较保守。

转录本，即基因通过转录形成一种或多种的可供编码蛋白质的成熟 mRNA，而在病毒基因组的转录中会形成多种不同的 HIV 转录本。编码 rev、tat 和 nef 的

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.